

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin
im Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhaus
Direktor: Professor Dr. med. Günter Stüttgen

**BESTIMMUNGEN DER ESTERASE-AKTIVITÄT
IN DER MENSCHLICHEN HAUT
MIT DEM SUBSTRAT O-NITROPHENYLACETAT**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Lutz Leßner aus Hohenlimburg

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin
im Städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhaus

Direktor: Professor Dr. med. Günter Stüttgen

BESTIMMUNGEN DER ESTERASE-AKTIVITÄT IN DER MENSCHLICHEN HAUT MIT DEM SUBSTRAT O-NITROPHENYLACETAT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Lutz Leßner aus Hohenlimburg

Referent: Dr. H. Bockendahl

Korreferent: Professor Dr. H.J. Dulce



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24. Nov. 1976

I n h a l t s v e r z e i c h n i s :

1. Einleitung	Seite 3
2. Materialien	Seite 4
3. Methoden	Seite 4
4. Graphische Darstellungen	Seite 7
5. Ergebnisse	Seite 15
6. Diskussion	Seite 19
7. Literatur	Seite 22
8. Zusammenfassung	Seite 23
9. Lebenslauf	Seite 24

E i n l e i t u n g :

Aus den in der Literatur bekannten Daten geht hervor, daß esterspaltende Fermente bisher in der Haut nur in geringen Mengen gefunden werden konnten. Neben den Untersuchungen von S p i e r (13), der eine saure Phosphatase mit relativ hoher Aktivität beschrieben hat, seien die Untersuchungen von M a g n u s und T h o m p s o n (8) einerseits und die von S t ü t t g e n (14) andererseits in diesem Zusammenhang erwähnt. Den genannten Autoren gelang es, mit Hilfe der Warburg-Technik, die Acetylcholinesterase in kleinen Mengen nachzuweisen.

Die im Blut der Säuger vorkommenden Esterasen sind mit einer Unzahl verschiedenster Methoden untersucht worden. Wegen der geringen Aktivitäten der Hydrolasen in der Haut lag dieser Arbeit die Absicht zugrunde, unter Verwendung einer Methodik mit einem relativ empfindlichen, dafür nicht besonders spezifischen Substrat quantitative Bestimmungen durchzuführen. Dafür bot sich uns das o-Nitrophenylacetat an, das früher von uns in anderem Zusammenhang verwendet wurde (4). Fettsäureester des p-, aber auch des o-Nitrophenols als Substrate für die Bestimmung der Serumesterasen (6,9) finden in der Literatur seit Jahren Verwendung, wobei im Einzelfall, wenn nicht Ergebnisse entsprechender Paralleluntersuchungen zur Verfügung stehen, kaum zu entscheiden ist, ob die beobachteten Aktivitäten ganz oder auch nur teilweise auf das Vorkommen einer Acetylcholinesterase (6), einer Pseudocholinesterase oder auch einer unspezifischen Aryl-esterase (12) bezogen werden müssen. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion noch einmal zurückzukommen sein.

Materialien:

Ausgangsmaterial zur Gewinnung des Enzyms war intakte Haut von amputierten Mammæ, die entweder sofort verarbeitet wurde oder höchstens zwei Stunden bei $+4^{\circ}$ im Kühlschrank lagerte. Die verwendeten Chemikalien waren handelsübliche p.a.-Präparate.

Methoden:

An der amputierten Mamma wurde ein unverletzter Teil der Haut herausgesucht und die Cutis vom subcutanen Fett herunterpräpariert, woran anschließend das restliche Fett mit einem Skalpell möglichst vollständig entfernt wurde. Überschüssiges Nerven, das zur Desinfektion des Operationsfeldes benutzt worden war, mußte gebunden werden, damit später freiwerdendes Enzymprotein nicht beschädigt werden konnte. Deshalb wurde der gesamte Hautlappen mit einer Lösung Lab-trol/physiologische Kochsalzlösung 1:1 (v/v) gewaschen und anschließend mit kaltem Wasser abgespült und in einem Tuch getrocknet.

Dann wurde die Haut in kleine Teile zerschnitten. Jeweils 3 g wurden in einem Meßzylinder abgewogen und mit 18 ml 0,05 m Tris-Maleinat-Puffer, pH 7,0, enthaltend 0,15 m NaCl und 0,04 m $MgCl_2$ und außerdem 2 ml 0,001 m Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt. Die Kühlung des Ansatzes erfolgte mit einem Gemisch aus Eis, Kochsalz und Methanol. Unter fortlaufender Temperaturkontrolle wurde dann die Suspension mit dem Ultraturrax bei 24 000 Umdrehungen pro Minute 4mal je 10 Sekunden homogenisiert, wobei die Temperatur $+1^{\circ}$ nicht unter- und $+4^{\circ}$ nicht überschreiten durfte. Die vereinigten Homogenate wurden anschließend bei 6 000 Umdrehungen 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und als Ausgangsmaterial für die folgenden Schritte in Eiswasser aufbewahrt.

Zunächst folgte eine Enzymaktivitätsmessung in dieser Ausgangslösung. Die Reaktionsansätze enthielten in einer 1 cm Küvette 2 ml einer Lösung, deren Zusammensetzung 0,05 M Tris-Maleinat-Puffer, pH 7,0, 0,15 M NaCl und 0,04 M HgCl_2 war und außerdem 0,1 ml Homogenat und 0,2 ml Substratlösung (124 mg o-Nitrophenylacetat in 100 ml Dioxan/Wasser 1:1 (v/v) enthielt. die Reaktion wurde durch Substratzugabe gestartet. Gemessen wurde bei 405 nm und 20° am Eppendorf-Photometer. Die mit 100 multiplizierten Extinktionsdifferenzen in einem solchen Ansatz pro Minute wurden als relative Aktivitätseinheiten bezeichnet (4,5). Die Messung erfolgte über 2 Minuten. Bei geringen Aktivitäten wurden 0,2 ml Homogenat hinzugefügt.

Nach Bestimmung der Ausgangsaktivität wurde das Protein durch Zugabe von Ammoniumsulfat in steigenden Mengen nach der von Bücher und Mitarbeitern (3) beschriebenen Methodik fraktioniert ausgefällt. Dabei erfolgte die Zugabe des Salzes zum Überstand des Ausgangshomogenates kontinuierlich in einem eiswassergekühlten Standzylinder, wobei die Lösung unter Verwendung eines "Plümpers" gemischt wurde. Zunächst wurde der Inhalt des Zylinders auf 20 Gew.-% Ammoniumsulfat gebracht. Nach einer halben Stunde konnte dann das gefällte Eiweiß abzentrifugiert werden (6 000 Umdrehungen/Min., 15 Min.). Durch eine stufenweise Steigerung der Ammoniumsulfat-Konzentration um jeweils 2 Gew.-% wurden weitere Fraktionen erhalten. Diesen Prozeß wiederholten wir so oft, bis im Überstand eine Ammoniumsulfat-Konzentration von 40 Gew.-% erreicht war.

Die einzelnen Sedimente wurden erneut in Tris-Maleinat-Puffer gelöst und die Fermentaktivität von Sediment und Überstand in jedem Versuch bestimmt. In einem Experiment bestimmten wir auch den Eiweißgehalt der Fraktionen.

Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach Weichselbaum in der Modifikation von Bücher (3).

Arbeitsweise: In ein Zentrifugenglas pipettiert man 0,1 ml der zu untersuchenden Lösung, ergänzt mit aqua dest auf 0,43 ml und fllt das Eiweiß durch Zugabe von 0,15 ml 3 n Triethyressigsure aus. Nach gründlicher Durchmischung wird der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus dem Filtrat setzt man 3 ml Biuret-Reagens hinzu und fllt mit aqua dest auf 10,0 ml auf. Nach 30 Minuten erfolgt die Ablesung der Extinktion bei 540 nm im Photometer, aus der sich unter Verwendung eines Standardwertes mit Lab-trol die Eiweißkonzentration berechnen lässt.

Die Ammoniumsulfat-Konzentrationen bestimmten wir photometrisch nach K e s l e r, ebenfalls nach der von B  c h e r angegebenen Modifikation.

Arbeitsweise: Die zu untersuchende Lösung wird mit verdünnter Schwefelsäure 1:1 0,00 verdnnst. Davon wird 1 ml unter Zusatz einer Mischung von Ne l l e r s Reagens A und B unter Rhren mit verdünnter Schwefelsäure auf 50 ml aufgefüllt und die Extinktion dieser Lösung nach 5 Minuten im Eppendorf-Photometer bei 436 nm bestimmt. Aus dem Zuwachs der Extinktion gegenüber einem Blindwert lässt sich die Konzentration in einfacher Weise berechnen.

Hinsichtlich der Methodik weiterer Experimente zur Isolierung und Konzentrierung des Enzymeiweies wird auf das Kapitel "Ergebnisse" verwiesen.

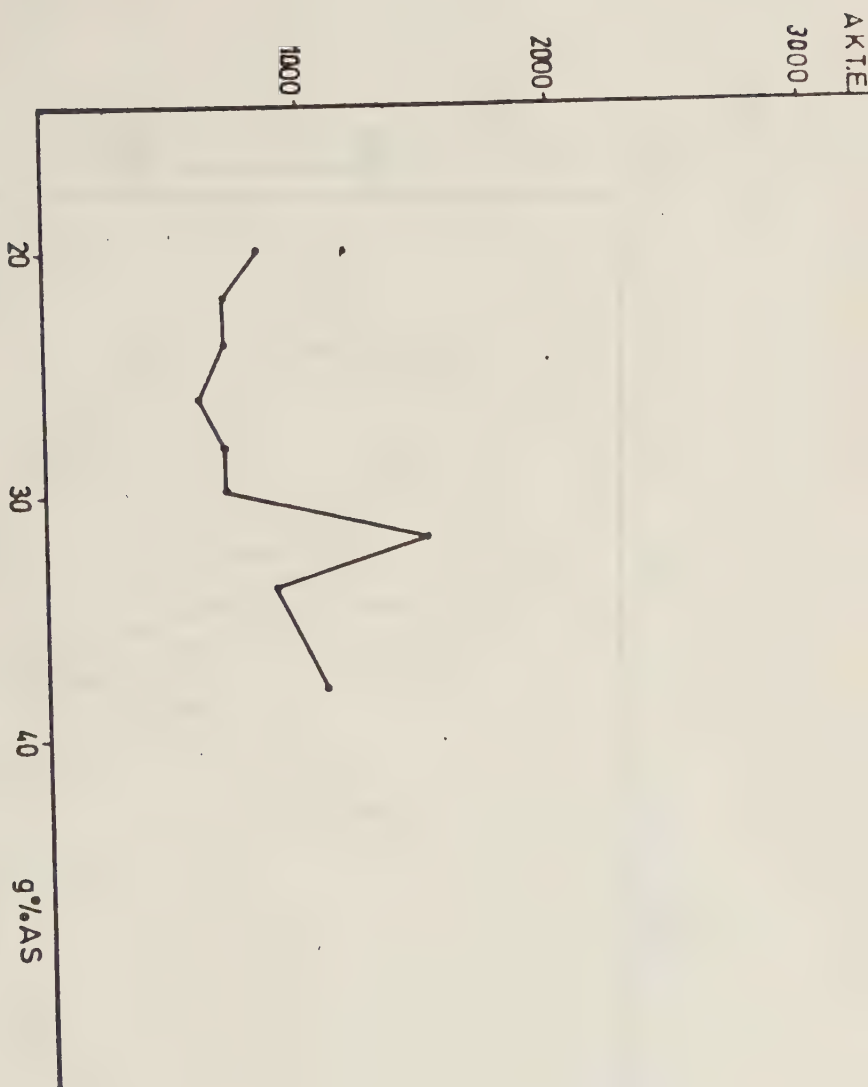


Abb.1. Wiedergabe einer fraktionierten Fällung des Eiweißes mit Ammonsulfat. Abszisse: Gew.-% Ammonsulfat. Ordinate: Fermentaktivität in relativen Aktivitätseinheiten.

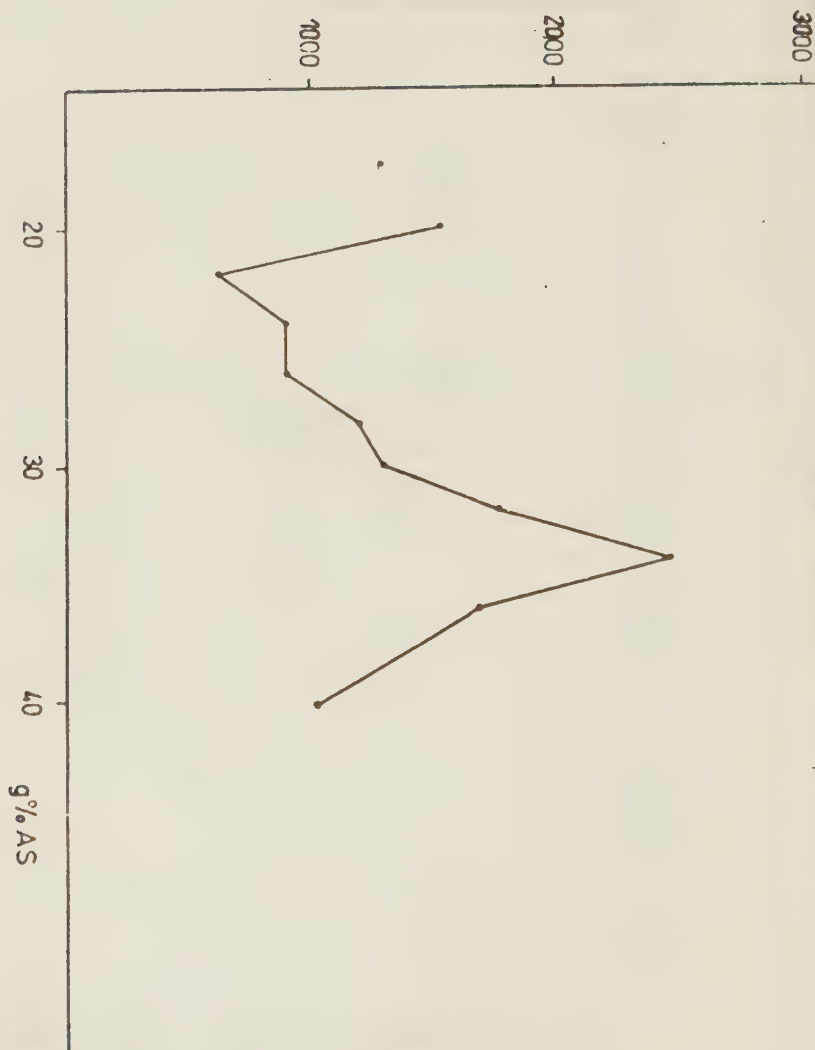


Abb.2. Wiedergabe einer fraktionierten Fällung des Eiweißes mit Ammonsulfat. Abszisse: Gew.-% Ammonsulfat
Ordinate: Fermentaktivität in relativen Aktivitätseinheiten

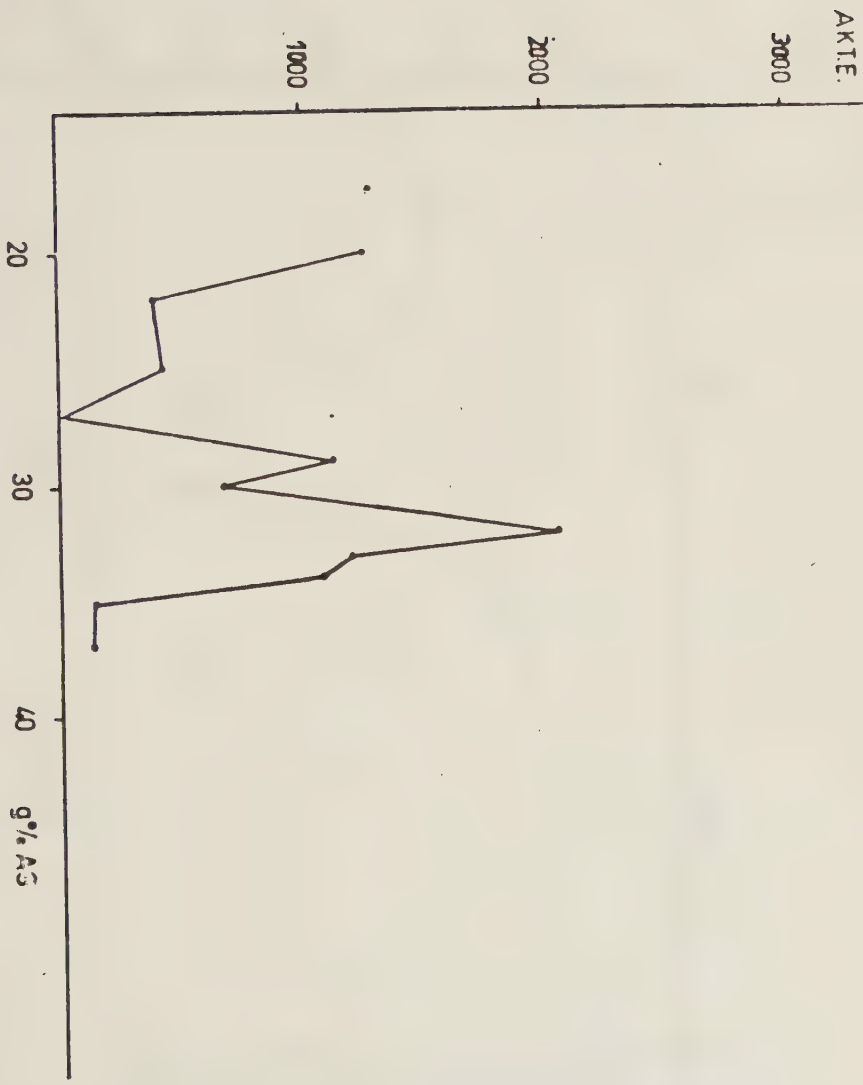


Abb.3. Wiedergabe einer fraktionierten Fällung des Eiweißes mit Ammonsulfat. Abszisse: Gew.-% Ammonsulfat. Ordinate: Fermentaktivität in relativen Aktivitätseinheiten.

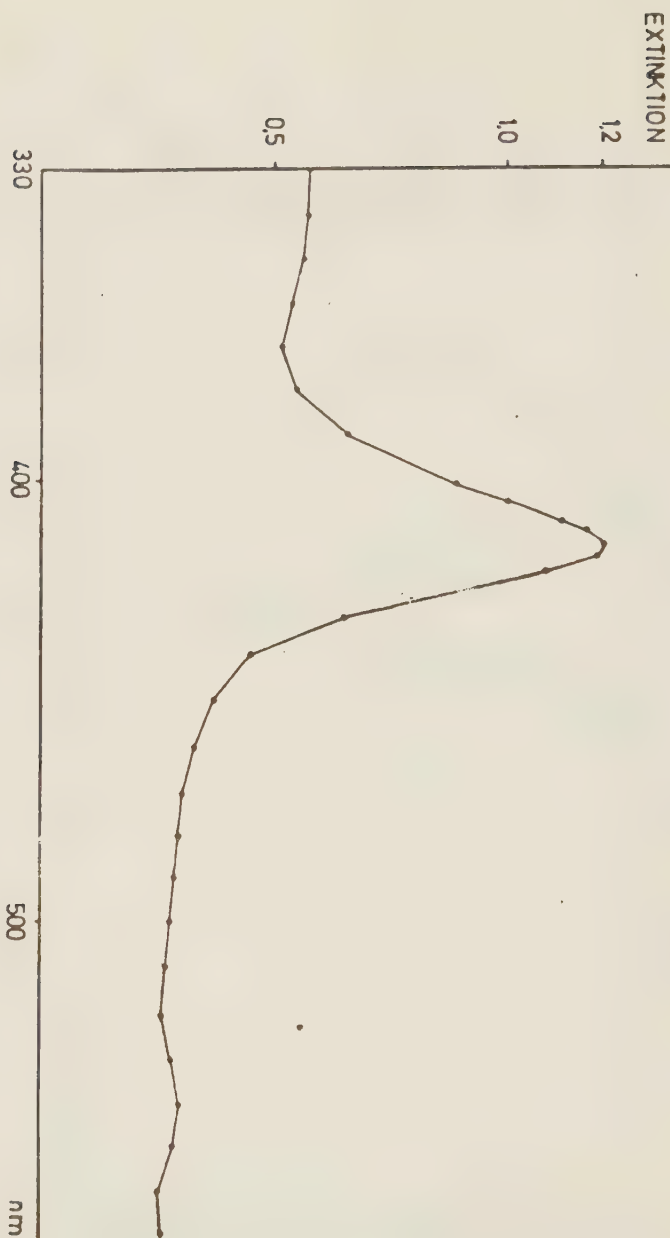


Abb.4. Wiedergabe der Spektralanalyse eines Sediments mit der höchsten spezifischen Aktivität.

Abzisse: Wellenlänge in nm. Ordinate: Extinktion.

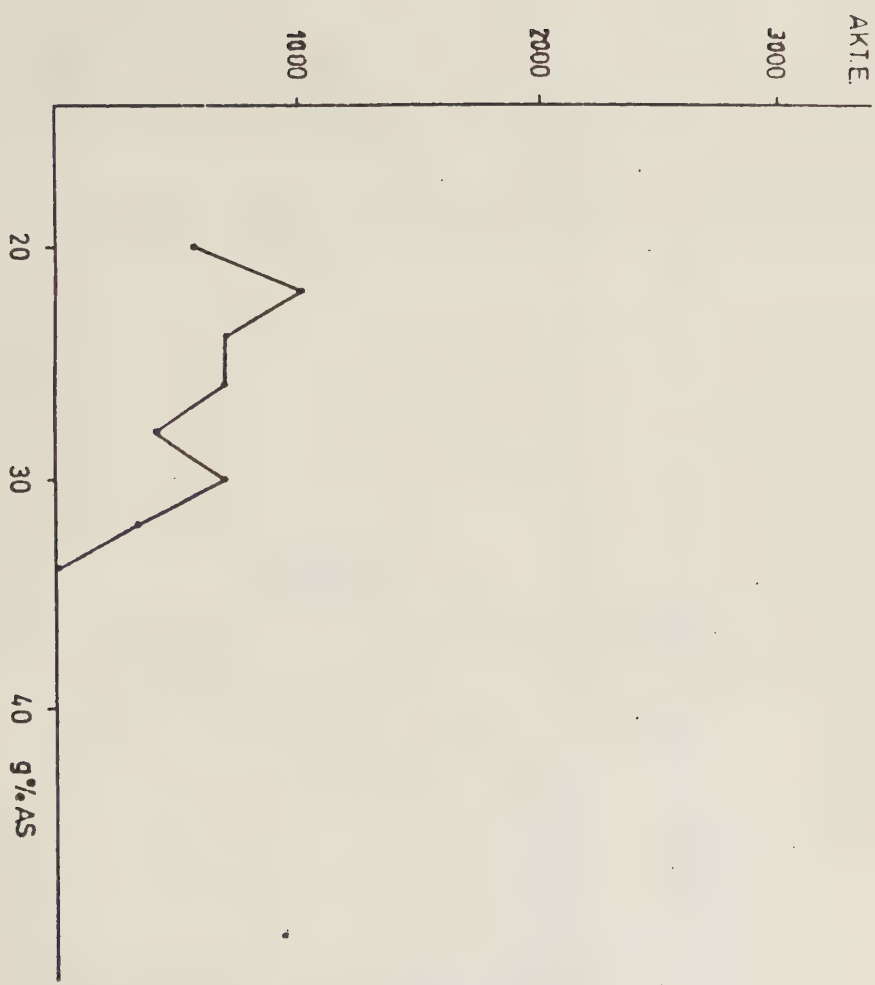


Abb.5. Wiedergabe der fraktionierten Fällung des Eiweißes einer hämolysierten Blutprobe.
Abszisse: Gew.-% Ammonsulfat. Ordinate: Fermentaktivität in relativen Aktivitätseinheiten.

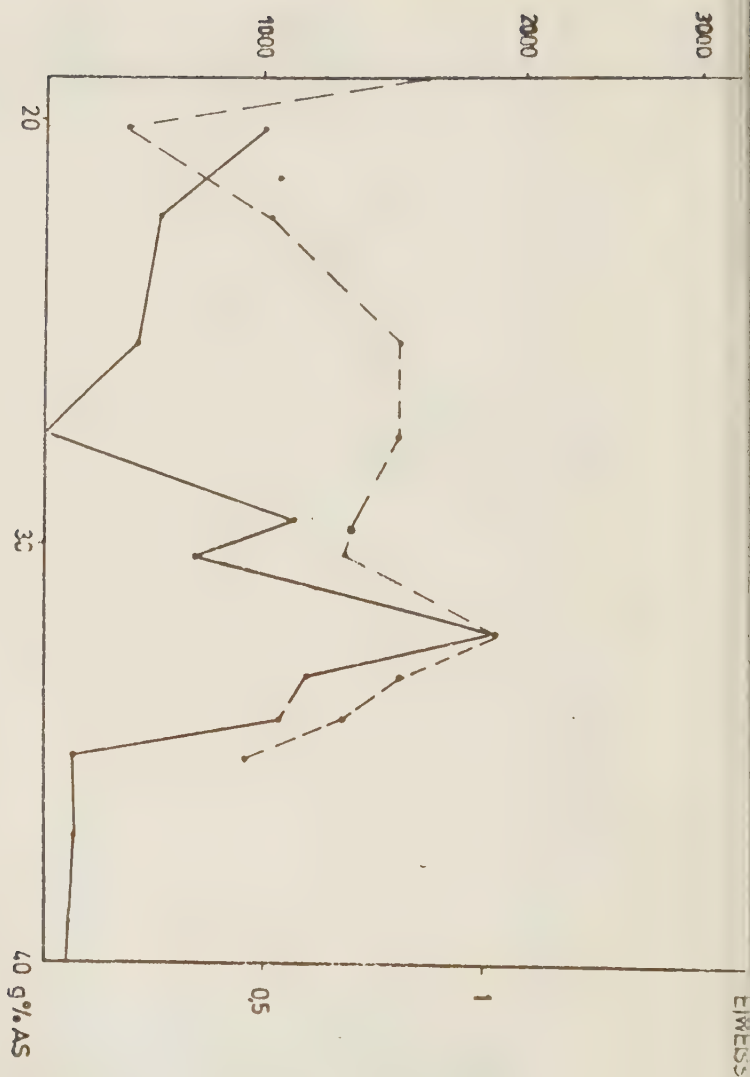


Abb.6. Wiedergabe der fraktionierten Fällung des Eiweißes mit Ammonsulfat. Abszisse: Gew.-% Ammonsulfat. Rechte Ordinate und gestrichelte Kurve: Eiweißmenge. Linke Ordinate und ausgezogene Kurve: relative Fermentakt.

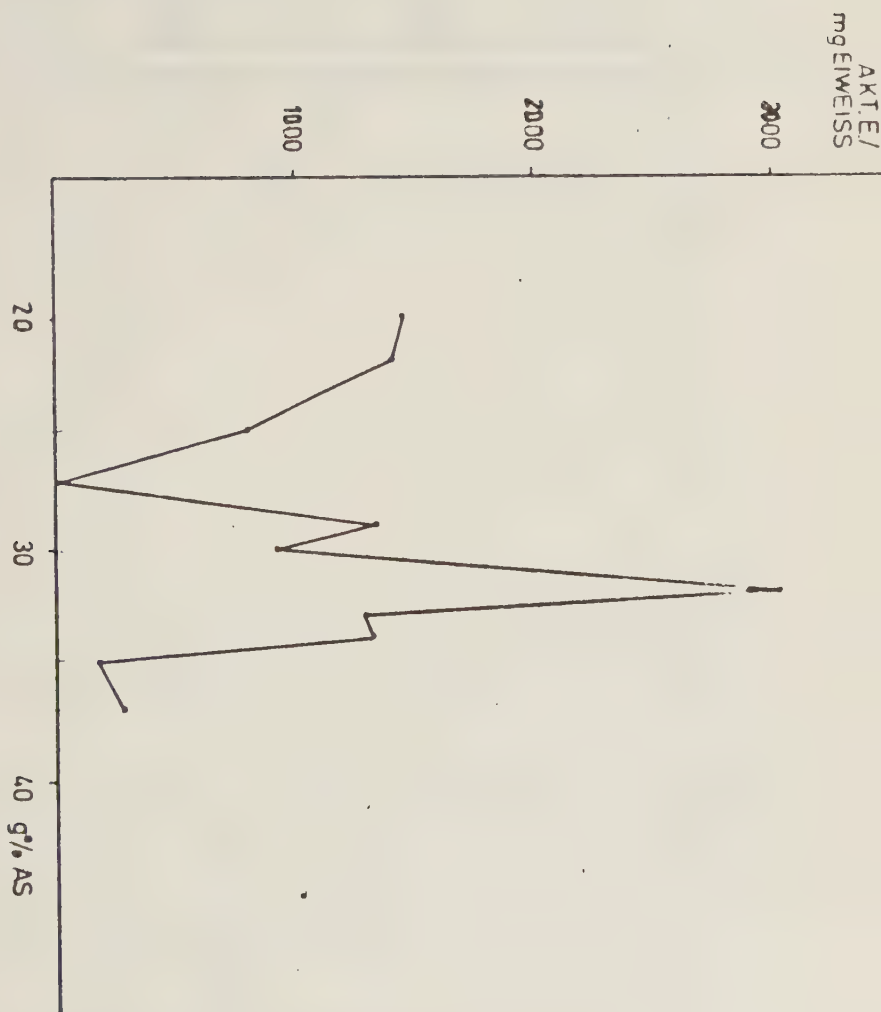


Abb.7. Darstellung der relativen spezifischen Aktivität.
Abszisse: Gew.-% Ammonsulfat. Ordinate: Relative spezifische Aktivität.

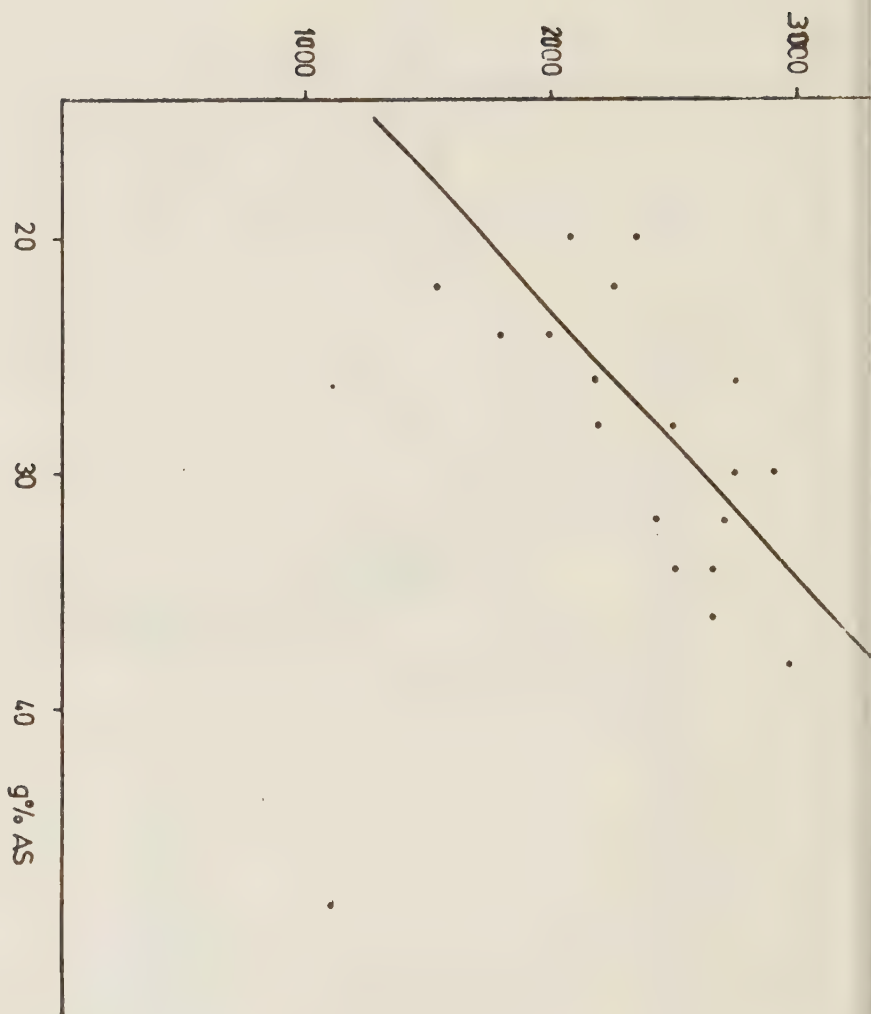


Abb. 8. Darstellung steigender Fermentaktivität eines Überstandes. Abszisse: Gew.-% Ammonsulfat. Ordinate: Relative Aktivitätseinheiten.

Ergebnisse:

1. Aktivitätsmessungen im Rohhomogenat der Haut:

Zunächst wurde der Überstand des Ausgangshomogenates einer jeden Hautprobe auf seinen Enzymgehalt untersucht. Tabelle 1 gibt die relativen Aktivitäten der homogenisierten und zentrifugierten Hautproben an:

Tabelle I: relative Aktivitätseinheiten/g Haut

1.	1356,6
2.	1209,0
3.	884,0
4.	786,2
5.	478,3
6.	476,0
7.	420,0
8.	592,0
9.	333,3

$$\bar{M} = 703,9$$

$$P = \pm 377,3$$

Es ergibt sich also eine beträchtliche Schwankungsbreite zwischen den gemessenen Einzelwerten. Die höchste Aktivität in einer Hautprobe beträgt etwa das 4fache derjenigen mit der niedrigsten Aktivität.

2. Tabelle II enthält eine nach dem Alter der Patientinnen geordnete Übersicht. Da nicht bei allen Hautproben das Alter der Patientinnen angegeben wurde, konnte nur ein Teil der Ergebnisse ausgewertet werden.

Tabelle II: relative Aktivitätseinheiten/g Haut in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Patientinnen.

1.	78 Jahre	478,3
2.	70 Jahre	884,0
3.	62 Jahre	420,0
4.	42 Jahre	1209,0
5.	35 Jahre	333,3

Die Aktivitäten lagen also zwischen 1209,0 und 333,3. Ihre Höhe ist offensichtlich nicht vom Alter abhängig.

3. In den Abbildungen 1, 2 und 3 sind die Ergebnisse der fraktionierten Fällung des aktiven Eiweißes aus dem Ausgangshomogenat aufgezeichnet. Die höchsten Aktivitäten sind demnach in den Proteinfractionen vorhanden, die mit Ammoniumsulfatkonzentrationen zwischen 32 und 36 Gew.-% erhalten wurden.

4. Die Fraktionen mit der höchsten Fermentaktivität waren leicht rot gefärbt. Es ergab sich daraus die Vermutung, daß kleinste Beimengungen von Blut vorhanden waren. Die Beobachtungen eines Absorptionsmaximums bei etwa 400 nm in der Spektralanalyse bestätigte diesen Verdacht. Es handelt sich hier um die sog. Soret-Bande, die allen Porphinderivaten gemeinsam ist. Das Absorptionsspektrum ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

5. Um nun auszuschließen, daß die beobachteten Fermentaktivitäten durch die im Stroma der Erythrozyten enthaltenen Acetylcholinesterase hervorgerufen wurden, wurde hämolysiertes und nicht hämolysiertes Vollblut der Fraktionierung mit Ammoniumsulfat unterworfen. In Abbildung 5 ist zu erkennen, daß die Sedimente (32 bis 36 Gew.-% Ammoniumsulfat), welche bei den Hautproben die höchsten Aktivitäten erbrachten, im Blut in ihrer Aktivität gegen 0 gingen. Durch diesen Versuch konnte ausgeschlossen werden, daß die esteratische Wirkung unseres Hauthomogenates auf Beimengungen von Blut, sowohl von Erythrozyten als auch von Serum, zurückzuführen ist.

6. Die Fermentaktivität läßt sich mit dem Eiweißgehalt korrelieren. In den Sedimenten mit hoher Aktivität ist die höchste Konzentration des Eiweißes zu finden (vergl. Abbildung 6). Die Darstellung der relativen spezifischen Aktivität (Quotient aus der Summe der in einer Fraktion gemessenen relativen Aktivitätseinheiten und deren Proteinmenge in mg) zeigt ebenfalls ein Maximum im Bereich der höchsten Fermentaktivität (vergl. Abbildung 7).

7. Überraschend war die Beobachtung, daß im Verlaufe der Fraktionierung die Aktivitäten der Überstände gegen o-Nitrophenylacetat gleich blieben oder auch leicht anstiegen. Aus diesem Grunde wurden einem Überstand aus Rohhomogenat steigende Mengen Ammoniumsulfat zugesetzt und die Aktivitäten gemessen. Das ausgefällte Eiweiß wurde nicht abzentrifugiert, jedoch der durch abpipettieren gewonnene Überstand zur Messung verwendet. Es ergab sich eine kontinuierliche Aktivitätszunahme mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration (vergl. Abbildung 8). In allen Versuchen wurde das von der Fa. Merck hergestellte "Ammoniumsulfat für biochemische Zwecke" verwendet.

Um eine nicht durch eine Esterase bewirkte, unspezifische Hydrolyse des Substrates auszuschließen, wurde eine Lösungsreihe steigender Ammoniumsulfat-Konzentrationen mit allen Bestandteilen des Reaktionsansatzes außer dem Enzymprotein angesetzt. Dabei wurde jedoch keine o-Nitrophenylacetat-Spaltung beobachtet. Ein Einfluß von Verunreinigungen durch Ammoniumsulfat auf die Fermentaktivitäten in den Sedimenten konnte jedoch durch sorgfältiges Waschen ausgeschaltet werden.

8. Weiterhin wurde untersucht, welche Verteilung das Enzym über die Schichten der Haut besitzt. Für diese Untersuchung wurden die Hautlappen mehrfach mit einem Reißgerät auf das 1,5fache ihrer Ausgangslänge gestreckt. Hierbei trennt sich die Epidermis vom Corium, so daß das Erstgenannte abgezogen werden kann. Dann wurden Ganzhaut, abgezogene Epidermis und Corium nach Herstellung der Ausgangshomogenate in ihrer esteraseischen Aktivität gemessen. Im Corium fanden sich zwei Drittel der Aktivität der Gesamthaut, in der Epidermis das restliche Drittel.

9. In Extraktionsversuchen ohne vorhergehende Homogenisation der Haut wurde eine bestimmte Hautmenge in einem entsprechenden Volumen Pufferlösung inkubiert. Nach 1 Stunde, 3 Stunden und 6 Stunden wurden Proben der Flüssigkeit entnommen und photometrisch untersucht. In keinem Ansatz wurde eine Fermentaktivität gegenüber o-Nitrophenylacetat gemessen.

Daraus kann geschlossen werden, daß das Enzym an gewisse Strukturen der Haut fixiert ist und erst bei deren Zerstörung freigesetzt wird.

10. Es wurden weitere Versuche zur Isolierung und Konzentrierung des Enzymeiweißes unternommen:

Die zwischen 32 und 36 Gew.-% Ammoniumsulfat ausgefüllten Eiweißfraktionen wurden in Tris-Maleinat-Puffer gelöst, vereinigt und über Nacht mit Carbowax (Polyäthylenglykol 20 000) eingeeengt. (7) Das eingeengte Volumen wurde dann 12 Stunden gegen 0,03 M Phosphatpuffer nach Sørensen, pH 5,9, bei +4° dialysiert und danach an einer Säule durch Gradienten-Elution mit Kochsalz aufgetrennt. Die Säulenfüllung bestand aus P-Cellulose, einem phosphorylierten Kationenaustauscher, der mit 0,03 M Natriumphosphat-Puffer, pH 5,9, equilibriert worden war. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler in 1,5 ml Fraktionen unterteilt und deren Aktivität bestimmt. Ebenfalls wurde die Eiweißkonzentration ermittelt. Während des gesamten Versuches hielten wir eine Temperatur von +4°. Obwohl für die Weiterverarbeitung nur Ausgangshomogenat mit relativ hoher Aktivität in Frage kam, reichte die aus der Haut freigesetzte Absolutmenge an Enzymeiweiß nicht aus, um abschließend noch eine erfolgreiche Gradienten-Elution durchzuführen. Innerhalb von 12 Stunden verlor jede Sedimentlösung etwa die Hälfte ihrer Aktivität. Auch nach Vürzung der Vorbereitungszeit durch Auslassen der Einengung mit Carbowax wurden keine besseren Ergebnisse erzielt.

D i s k u s s i o n :

Auffallend sind die geringen Aktivitäten der Esterasen, die wir in den Rohhomogenaten fanden. Unter Verwendung des molaren Absorptionskoeffizienten des o-Nitrophenols lassen sich die bisher von uns angegebenen Werte in internationale Einheiten umrechnen. Dabei ergibt sich ein Wert von etwa 1,50 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Haut/min. Demgegenüber teilen Thomsen und Whittaker (15) mit der Ferry-A-Verfahren gemessene Aktivitäten mit, die etwa $1/5$ unserer Werte ausmachen. Sie fanden, ebenfalls in einem Rohhomogenat, 0,305 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Haut/min. Acetylcholin-aktive Aktivität. Stüttgen (11) will durch Hemmversuche belegt haben, daß es sich dabei vorwiegend um die Pseudocholinesterase handelt, während die Acetylcholinesterase nur in ganz geringen Mengen in der Haut vorkommt. Da nun die von uns gemessenen Aktivitäten bedeutend höher liegen als die zitierten Literaturbefunde, erhebt sich die Frage, welche Fermente an der Spaltung des von uns gewählten Substrates o-Nitrophenylacetat beteiligt sein können; denn aus äußeren Gründen war uns eine Bestimmung der Acetylcholin-spaltung nicht möglich. Ebenfalls konnten keine Experimente mit spezifischen Inhibitoren durchgeführt werden, deren Ergebnissen nur so eine gewisse Fragwürdigkeit anhaftet (4), die aber immerhin gewisse Hinweise auf eine Zuordnung des beobachteten Fermentes erlaubt hätten. Hemmversuche verboten sich deshalb, weil wegen der geringen Aktivitäten der Versuchsfehler zu groß geworden wäre.

Zeller, Pleischer, Kerschbaum und Schwegge (17) haben nachgewiesen, daß eine gereinigte Acetylcholinesterase aus Erythrozyten o-Nitrophenylacetat spaltet. Block und Hill und Hiller (5) konnten zeigen, daß ein Präparat der Acetylcholinesterase aus der Hämolymphe von *Helix pomatia* das entsprechende o-Isomere hydrolysiert. Whittaker (16) untersuchte eine Reihe

substituierter Phenylacetate, die sich sowohl als Substrate der Acetylcholinesterase als auch als solche der Pseudochoolinesterase erwiesen.

Die colorimetrische Bestimmung der Serumeesterase mit Estern des *p*-Nitrophenols geht auf H u g g i n s und L a p p i d e (3) zurück, die in einer älteren Publikation von der These ausgingen, daß im Blut neben der echten Acetylcholinesterase eine hauptsächlich im Serum vorkommende Esterase mit einer anderen Substratspezifität und anderen kinetischen Eigenschaften beobachtet werden könne. Diese nannten sie in Übereinstimmung mit R i c h t e r und C r o f t (12) Ali-esterase. In weiteren Untersuchungen über die in Säugerseren vorhandenen Esterasen gelang A l d r i d g e (1) der Nachweis, daß es sich dabei um mindestens zwei verschiedene Typen handeln müsse, von denen die eine nicht durch Diäthyl-*p*-Nitrophenylphosphat (E 600) hemmbar ist und *p*-Nitrophenylacetat relativ schnell spaltet (A-Esterase). Das andere Ferment, die B-Esterase, läßt sich durch diesen Inhibitor hemmen. Hierin unterscheidet es sich nicht von der Acetylcholinesterase und der Pseudochoolinesterase. Von diesen Befunden ausgehend, klassifizierte A u g u s t i n s s o n (2) die im Serum verschiedener Tiere vorkommenden Enzyme. Hiernach sind A-Esterasen solche, die ausschließlich Arylester spalten und B- und C-Esterasen solche, die unter anderem sich hydrolysieren. Später konnte auch R i l z (11) zeigen, daß sich im menschlichen Serum neben den acetylcholinspaltenden Enzymen noch weitere "unspezifische" Esterasen nachweisen lassen.

Demnach läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, auf welches oder auf welche Fermente die von uns aus der Haut isolierten Hydrolyseaktivitäten zurückzuführen sind. Daß wir fünf- bis sechsfach größere Aktivitäten als T h o m p s o n und W h i t t a k e r (15) fanden, mag mindestens teilweise durch die Mitwirkung anderer Enzyme als die acetylcholinspaltenden

erklärt werden. Jedoch kann außerdem eine Rolle spielen, daß wir bei der Herstellung der Gewebshomogenate sehr schonend vorgehen und die effizienteste Aufarbeitungsmethodik der Haut vor Beginn der eigentlichen Experimente in Versuchsreihen verschiedener Anordnungen ermittelten. Auch seien in diesem Zusammenhang die von uns gewählten Versuchsbedingungen erwähnt, die sich von der Warburg-Technik abgesehen vom Substrat durch den pH-Wert und die Ionenstärke unterscheiden.

Durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat konnten Fraktionen mit gegenüber dem Ausgangshomogenat deutlich erhöhter Aktivität erhalten werden. Das beste Versuchsergebnis beinhaltet eine 150fache Anreicherung gegenüber dem Überstand des Ausgangshomogenates, dessen spezifische Aktivität 170 $\mu\text{u}/\text{mg}$ Eiweiß/min. betrug.

Offenbar ist die beschriebene esteratische Aktivität in der Haut strukturfixiert, da ohne vorausgehende Homogenisation keine Substrathydrolyse beobachtet werden konnte. Wenn auch der größte Anteil der Enzymaktivität im Corium aufgefunden wurde, ließ sich doch durch entsprechende Paralleluntersuchungen die Möglichkeit ausschließen, daß das oder die Fermente aus dem Blut stammten.

Beachtung verdient schließlich die Tatsache, daß das Ferment durch Ammoniumsulfat aktivierbar ist. Aus der Literatur (10, 6) sind Aktivierungen durch Kationenzusätze bekannt. Doch treten diese in der Regel bei geringeren Ionenstärken ein. Zur Erklärung unserer Befunde bleibt daher die Möglichkeit, daß entweder das von uns benutzte Ammoniumsulfat kleine Beimengungen von Aktivatoren enthielt oder auch, daß mit steigenden Salzkonzentrationen aus strukturfixiertem Enzymeiweiß, das an kleinste Zellpartikel gebunden war, zusätzliche Aktivitäten freigesetzt wurden.

L i t e r a t u r :

1. Aldridge, J.N.: Bioche.J.53, 110 (1953).
2. Augustinsson, K.B.: Nature 181, 1786 (1958).
3. Seisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeleiderer: Z. Naturforschg. 8b, 555. (1953).
4. Sockendahl, H. u. Th.M. Müller: Hoppe-Seyler's Z. phyliol. Chem. 334, 137 (1963).
5. Sockendahl, H. u. Th.M. Müller: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 341, (1965).
6. Higgins, C. u. J. Lipides: J. biol. Chem. 170, 467 (1947).
7. Kohn, A.: Nature (London) 183, 1055 (1959).
8. Magnus, I.A. u. R.H.S. Thompson: Brit. J. Derm. 66, 163 (1954).
9. Main, A.N., K.E. Miles u. P.E. Braid: Biochem.J. 78 739 (1961).
10. Margolis, R. u. P. Feigelson: J. biol. Chem. 238, 3670 (1963).
11. Pilz, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 1 (1962)
12. Richter, D. u. P.G. Croft: Biochem. J. 36, 746 (1942).
13. Spier, H.W., G. Pascher u. K. Martin: Dermatologica 11, 9 (1955).
14. Stüttgen, G.: Arch. klin. exp. Derm. 201, 564 (1955).
15. Thompson, R.H.S. u. V.P. Whittaker: Biochem. J. 38, 205 (1944).
16. Whittaker, V.P.: Physiol. Rev.31, 312 (1951).
17. Zeller, E.A., R.A. McNaughton, J.S. Schweppe: Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., 71, 526 (1949).

Z u s a m m e n f a s s u n g :

1. Es wird eine Methodik beschrieben, mit der es gelingt, in homogenisiertem Hautmaterial eine esteratische Aktivität mit o-Nitrophenylacetat als Substrat nachzuweisen.
2. Durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat konnte das aktive Eiweiß isoliert werden. Die höchsten Aktivitäten wurden jeweils im Bereich zwischen 32 und 36 gew.-% Ammoniumsulfat beobachtet.
3. Es gelang, die esteratischen Proteine gegenüber dem Ausgangshomogenat um das 150fache anzureichern.
4. Versuche einer weitergehenden Anreicherung und einer Einordnung der Fermentaktivität mißlingen.
5. Eine Aktivierung der Substrathydrolyse mit steigender Ionenstärke wurde festgestellt.
6. Durch vergleichende Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Enzymaktivität aus dem Blut stammte.
7. Die Hauptmenge des Fermentes wurde in der Cutis gefunden.
8. Eine Altersabhängigkeit der beobachteten Enzymaktivitäten bei den untersuchten Patienten konnte nicht ermittelt werden.

L e b e n s l a u f :

am 31. März 1942 in Hohenlimburg Kr. Iserlohn geboren; dort die Volksschule und das Städtische Gymnasium bis zur Obersecunda besucht. Abitur im Februar 1963 am Gymnasium in Altena abgelegt. Anschließend 1 Semester Theologie an der Universität Heidelberg, 2 Semester Jura an der Freien Universität Berlin. Ab Winter 1964 Medizin-Studium in Berlin und Wien. Im Februar 1971 das Staatsexamen in Berlin abgeschlossen.

